

# **A transzmembrán klorid transzporterek szerepe a könnyemirigy vezetéksejtek folyadék szekréciójában**

Vizvári Eszter, M.D.

Ph.D. Tézis

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

Témavezető: Tóth-Molnár Edit, M.D., Ph.D.

Szemészeti Klinika,

Szegedi Tudományegyetem,

Szeged

2017.

## **AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:**

### **Az értekezés alapját képező közlemények:**

- I.**     **Vizvári E**, Katona M, Orvos P, Berczeli O, Facskó A, Rárosi F, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr., Hegyi P, Ding C, Tóth-Molnár E. Characterization of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  cotransporter activity in rabbit lacrimal gland duct cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57(8): 3828-3856.

**IF: 3.303**

- II.**     Katona M, **Vizvári E**, Németh L, Facskó A, Venglovecz V, Rakonczay Z Jr, Hegyi P, Tóth-Molnár E. Experimental evidence of fluid secretion of rabbit lacrimal gland duct epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55(7): 4360-4367.

**IF: 3.404**

### **Egyéb közlemények:**

- III.**     Kalász H, Tekes K, Pöstényi Z, **Vizvári E**, Sótonyi P, Szabó D, Tóth-Molnár E. Pharmacokinetics of selegiline in a rabbit model. *Letters in Drug Design and Discovery*, 2016; 13(8): 752-756.

**IF: 1.1**

## 1. BEVEZETÉS

A könnyfilm alapvető szerepe a szemfelszín védelme. A könnyfilm szekréciója a könnymirigy és járulékos mirigyek, valamint a beidegzésüket végző szenzoros és autonóm idegrostok együttműködése révén valósul meg. Ez a funkcionális egység biztosítja a könnyfilm stabilitását és ezáltal az egészséges szemfelszínt, nem megfelelő működése következtében kialakuló száraz szem betegség pedig a leggyakoribb szemészeti problémák közé tartozik. A könnymirigy működésével kapcsolatos ismereteink messze nem teljesek, így a könnytermelés élettanának és kórélettanának részletesebb megismerése alapvető fontosságú. Számos tanulmány feltételezi, hogy a könnymirigy duktuszoknak meghatározó szerepe van a könnytermelésben. Az elmúlt évtizedben két új, a könnymirigy duktális epitél sejteinek működését vizsgáló módszer került publikálásra. Ubels és munkatársai fagyasztott patkány könnymirigy duktális sejteken lézer mikrodisszekciós technikával végzett gén expressziós vizsgálatait ismertették. A duktális sejtek vizsgálatának azon módszere, mely elsőként teszi lehetővé a duktuszok működésének funkcionális vizsgálatát, munkacsoportunk által került kifejlesztésre és leírásra. Az új izolálási technikának köszönhetően életképes duktusz szegmentumokon végezhetőek olyan vizsgálatok, mint például a különböző ion transzportereknek a könnymirigy duktusok működésében és szabályozásában betöltött szerepe. Kutatócsoportunk által nemrégén publikált tanulmányban az eredetileg Fernandez-Salazar által hasnyálmirigy folyadék szekréciójának vizsgálatára kifejlesztett videó-mikroszkópos technika átdolgozása révén izolált könnymirigy duktuszok folyadék szekrécióján végzett kísérleteink eredményeit ismertettük. Kísérleteink során a basolaterális  $\text{HCO}_3^-$  transzporter gátlása szinte nem befolyásolta a folyadék szekréciót, míg a basolaterális  $\text{Cl}^-$  felvételt gátló bumetanide teljes mértékben megszüntette azt. Ez alapján a  $\text{Cl}^-$  transzport mechanizmus  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióval szembeni predomináns szerepe feltételezhető a nyúl könnymirigy duktuszainak folyadékszékreciója során. Mivel a bumetanide a duktális sejtek basolaterális membránján található Na-K-Cl kotranszporter 1 (NKCC1) jól ismert inhibitora, ez a transzport mechanizmus tűnik a sejtek legfőbb  $\text{Cl}^-$  felvevő folyamatának. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) fontos szerepet játszik a nyulak duktális folyadék szekréciójában (a forskolin, mely a CFTR jól ismert stimulátora, a duktusz szegmentumok szignifikáns duzzadását eredményezte). Korábbi eredményeink alapján az NKCC1 alapvető szerepet játszik a basolaterális  $\text{Cl}^-$  felvételben, míg a CFTR kulcsfontosságú szerepet tölt be az apikális membránon keresztül az intraluminális térbe történő  $\text{Cl}^-$  szekrécióban. A NKCC1 és a CFTR duktális szekrécióban

betöltött szerepéről szóló korlátozott ismereteink miatt további vizsgálatokat végeztünk ezen transzporterek szerepének pontos tisztázására. Kísérletek korábban igazolták már a NKCC1 patkányok, nyulak és egerek könnyimirigy duktális csatorna sejteinek basolateralis membránján történő jelenlétét, de kutatócsoportunk munkája az első kísérleti bizonyítéka a NKCC1 duktális epitélium szekréciójában betöltött szerepének és funkciójának. A CFTR-nak a különböző (hasnyál-, nyál-, verejtékmirigy, légúti hám) szekretoros epitéliumok homeosztázisának fenntartásában betöltött fontos szerepe széles körben igazolt. Ezzel ellentétben a CFTR könnyimirigy működésében betöltött szerepét korábban csak részben vizsgálták és a könnytermelésben betöltött szerepe teljes mértékben ismeretlen. Könnyimirigy gén expressziós vizsgálati eredményeinek összegzése alapján a duktális sejtekben a CFTR predominánsan expresszálódik, de ezek a vizsgálatok többnyire leíró jellegűek voltak, anélkül, hogy feltárták volna a CFTR könnyimirigy működésében betöltött funkcionális szerepét. Nyulak könnyimirigyének duktális szegmentumain korábban végzett kísérleteink során az izolált kisméretű, zárt duktusokon nem volt elérhető a lumenális tér, így nem sikerült közvetlenül vizsgálnunk az apikális membránon elhelyezkedő CFTR funkcióját. A CFTR gén defektusát hordozó transzgenikus egérmodell lehetővé tette a CFTR szerepének közvetlen vizsgálatát. Jelenlegi munkánk során a könnyimirigy kutatás első olyan vizsgálatát végeztük, mely ezen transzgenikus egérmodellek felhasználásával a CFTR-nak a könnyimirigy szekréciójában betöltött szerepére összpontosított.

## **2. CÉLKITŰZÉSEK**

Munkacsoportunk korábbi tanulmányai szerint az NKCC1 fontos szerepet játszik a könnycsatorna duktuszok működésében. Fontos szerepe van a CFTR transzporternek is, mivel a citoszolikus cAMP szint emelése az apikális membránon található CFTR proteint aktiválja. Ezért kísérleteink célja a következő volt:

**1, NKCC1 funkcionális szerepének és aktivitás profiljának vizsgálata izolált könnyimirigy duktuszokon**

**2, CFTR szerepének meghatározása a könnyimirigy szekréciós folyamataiban és a szemfelszín integritásának megtartásában, valamint a CFTR jelenlétének és funkciójának vizsgálata a duktuszok szekréciójában CFTR vad típus (WT) és knock-out (KO) állattörzsek könnyimirigyéből izolált duktuszokon.**

### **3. MÓDSZEREK**

#### **Kísérleti állatok**

Az NKCC1 vizsgálatokat felnőtt hím új-zélandi fehér nyulak könnymirigyéből izolált duktuszokon, a CFTR kísérleteket CFTR vad típus (WT) és knock-out (KO) egértörzsek könnymirigyéből izolált duktuszokon végeztük. Az összes állatkísérletet az ARVO Állatok Szemészeti Kutatásban történő felhasználásáról szóló irányelveinek betartásával végeztük. A vizsgálati protokollt a Szegedi Tudományegyetem Állattenyésztési Kutatóintézetének etikai bizottsága jóváhagyta, mely megfelelt az Európai Parlament 2010/63 / EU irányelvének.

#### **A könnysekreáció és a szaruhártya fluoreszcein festődésének mérése**

A könnytermelés mérését egerekben helyi érzéstelenítést követően fenol vörös festékkel impregnált pamutcérna segítségével végeztük. A szemfelszín integritásának értékeléséhez a kötőhártya zsákba fluoreszcein-nátriumot csepegtettünk, majd a réslámpa kobalt-kék szűrőjén keresztül biomikroszkópiát végeztünk. A corneális festődés mértékét a NEI osztályozó rendszere alapján határoztuk meg.

#### **H&E festés és immunofluoreszcencia**

A CFTR vad típus (WT) és knock-out (KO) egértörzsek könnymirigyéből izolált duktuszokat fixálást követően feldaraboltuk, majd hematoxillin-eozin festést végeztünk. Fagyasztást és rehidrációt ismételt fixálás követte. Az elsődleges antitestekkel egyéjszakás, majd a másodlagos antitestekkel 1 órás inkubálást végeztünk.

#### **Könnymirigy duktuszok izolálása és kultúrában tartása**

A könnymirigyekből darabolást, inkubációt és tárgylemezre helyezést követően sztereo mikroszkóp alatt inter és intralobuláris duktuszokat izoláltunk, majd azokat egy éjszakán át kultúrában hagytuk.

#### **Intracellularis pH mérés fluorofotometriával**

A duktuszokat pH érzékeny, fluoreszkáló BCECF-AM festékkel töltöttük fel és az intraceluláris pH értéket egy képkészítő rendszerrel mértük. Egy adott mérési területen belül 5-10 sejtet 490 és 440 nm-en gerjesztettünk, majd a fluoreszcein emissziós rátát 535 nm-en mértük.

#### **NKCC1 aktivitás mérése**

Az NKCC1 aktivitási sebességének mérésére ammónium-pulzus technikát alkalmaztunk az  $\text{NH}_4^+$  sejtbe való beáramlásának következtében kialakuló intracellularis savasodás

mértékének a meghatározásával. A fluoreszcein emissziós ráta emelkedése egyenesen arányos volt az intracellularis pH emelkedésével.

#### **Könnymirigy duktuszok folyadékszekréciójának mérése**

A duktuszok folyadékszekréciójának vizsgálatát videómikroszkóppal végeztük. Az interlobularis duktuszok zárt intraluminalis terébe történő folyadékszekréciója a luminális térfogat videómikroszkóppal detektálható növekedését eredményezte.

#### **Statisztikai analízis**

Az NKCC1 aktivitásának és a duktális folyadékszekréció mennyiségének meghatározásához vegyes ANOVA modellt használtunk. A könnyszekréció elemzését Dunn-módszerrel végzett Kruskal-Wallis teszttel végeztük. Az adatok elemzéséhez SPSS 22 statisztikai szoftvert alkalmaztunk. A 0.05-nél kisebb p értéket szignifikánsnak tekintettük.

### **4. EREDMÉNYEK**

#### **4.1. Az NKCC1 szerepe a könnymirigy duktális sejtek basolaterális klorid transzportjában**

##### **NKCC1 lokalizációja a nyúl könnymirigyben**

Immunfluoreszcencia segítségével az NKCC1 jelenléte mind az acinaris, mind a duktális sejtek basolaterális membránjában kimutatható (a festődés az acinusok esetében kifejezettebb).

##### **NKCC1 aktivitása nyúl könnymirigy duktuszokban**

Ismert, hogy az NKCC1 képes  $\text{NH}_4^+$ -t szállítani  $\text{K}^+$  kötő helyein alacsony  $\text{K}^+$  koncentráció esetén, pH változást idézve elő ezzel. Az ammónium indukálta savasodás mértéke csökkenthető magas kálium koncentrációjú oldat használatával. Annak igazolására, hogy a duktális sejtekben az  $\text{NH}_4^+$  transzport  $\text{Na}^+$ -függő módon történik, az ammónium pulzust nátrium-klorid helyett tetrametilamónium-klorid jelenlétében ismételtük. Nátrium hiányában az ammónium által kiváltott savasodás szignifikánsan csökkent. Az NKCC1 jelenlétére utaló, bumetanide érzékeny basolateralis transzportrendszer létezésének igazolására standard ammónium-pulzust alkalmaztunk mind bumetanide jelenlétében, mind annak hiányában. Bumetanide jelenléte esetén az  $\text{NH}_4^+$  pulzus indukálta savasodás szignifikánsan csökkent. Ezek az eredmények megerősítik egy olyan  $\text{Na}^+$  függő, bumetanide érzékeny transzporter létezését a duktális sejtekben, ahol a  $\text{K}^+$  és  $\text{NH}_4^+$  transzport versenyben van egymással, indirekt módon ezzel a NKCC1 jelenlétére.

### **NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pulzus ismétlésének hatása az acidifikáció második fázisának intenzitására**

Annak meghatározására, hogy az ammónium pulzus ismétlése önmagában befolyásolja-e a második fázis meredekségét, három egymást követő pulzust alkalmaztunk ugyanazon duktuszok esetében. Az ismétlődő pulzusok hatására a második fázis meredeksége nem változott, vagyis az NKCC1 aktivitásának mérésekor a pulzus ismétlésből adódó “fáradási effektussal” nem kell számolnunk.

### **Az NKCC1 alapaktivitása**

Annak meghatározására, hogy az NKCC1 alapaktivitása befolyásolja-e a mérési eredményeket, bumetanide jelenlétében és hiányában vizsgáltuk az NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pulzus hatására az acidifikáció második szakaszában bekövetkező intenzitás változást. Az NKCC1 alapaktivitása elhanyagolható mértékű és statisztikailag nem szignifikáns volt.

### **NKCC1 aktiválódása alacsony citoszolikus Cl<sup>-</sup> hatására**

Izolált könnyimirigy duktális szegmentumokat Cl<sup>-</sup>-mentes oldattal 20 percig előkezeltük, majd NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pulzust alkalmaztunk bumetanide jelenlétében és hiányában is. Az alacsony citoszolikus Cl<sup>-</sup> szint szignifikáns mértékben növeli az NKCC1 aktivitását.

### **NKCC1 aktiválódása hiperozmoláris környezet hatására**

Annak meghatározására, hogy az NKCC1 aktivitását hogyan befolyásolja a hiperozmoláris környezet, a duktuszokat 390 mOsm/l oldattal kezeltük bumetanide jelenlétében és hiányában is. A hiperozmoláris környezetváltozás, melyet a perfúziós oldat ozmolaritásának 290 mOsm/l értékről 390 mOsm/l értékre történő emelése idézett elő, szignifikáns mértékben megnövelte az NKCC1 aktivitását, bizonyítva ezzel, hogy a hiperozmoláris környezet fontos szerepet játszik az NKCC1 működésében.

### **NKCC1 aktiválódása karbachol, PMA és Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 hatására**

A kolinerg agonisták NKCC1 aktivitására gyakorolt hatását az acetilkolin analóg karbachol segítségével vizsgáltuk. Karbachollal történő előkezelést követően NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pulzust alkalmaztunk mind bumetanide jelenlétében és annak hiányában is. A kolinerg stimuláció hatására az acidifikáció második fázisának meredeksége növekedett a kontroll csoporthoz képest. A bumetanide jelenléte nem változtatta meg az NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pulzus hatására bekövetkező savasodás mértékének görbületét, igazolva, hogy a karbacholnak nincsen szignifikáns hatása az NKCC1 aktivitására. A kolinerg stimuláció könnyimirigy duktuszok NKCC1 aktivitására gyakorolt hatásának további tisztázására Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187-nak, valamint a protein kináz C (PKC) aktivátor PMA-nak a hatását vizsgáltuk. Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 történő előkezelést

követően  $\text{NH}_4^-$  pulzust alkalmaztunk bumetanide jelenlétében és hiányában is. A  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A23187 nem aktiválta a kotranszportert. Ezt követően forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) hatását vizsgáltuk. A PMA-val történő előkezelést követően  $\text{NH}_4^-$  pulzust alkalmaztunk bumetanide jelenlétében és hiányában. A bumetanide kezelés kismértékű, de szignifikáns csökkenést eredményezett az acidifikáció második fázisában.

#### **NKCC1 aktiválódása vazoaktív intesztinális peptid (VIP) hatására**

A VIP NKCC1 aktivitására gyakorolt hatását is vizsgáltuk. VIP-pel történő előkezelést követően  $\text{NH}_4^-$  pulzust alkalmaztunk mind bumetanide jelenlétében, mind annak hiányában. A VIP kezelés hatására fokozódott az acidifikáció meredeksége a második fázisban, melynek mértéke bumetanide hatására csökkent, igazolva ezzel, hogy a VIP fokozza az NKCC1 aktivitását.

#### **NKCC1 aktiválódása forskolin és sejt permeábilis cAMP analóg 8-bromo cAMP hatására**

Forskolinnal történő 5 perces előkezelést követően  $\text{NH}_4^-$  pulzust alkalmaztunk bumetanide jelenlétében és hiányában is. Forskolin hatására fokozódott az acidifikáció meredeksége a második fázisban, melynek mértéke bumetanide hatására csökkent, igazolva ezzel, hogy a forskolin fokozza az NKCC1 aktivitását. A megemelkedett citoszolikus cAMP szint NKCC1 aktivitására gyakorolt hatásának további tisztázására sejtpemeábilis cAMP analógot használtunk. 8-bromo cAMP-vel történő előkezelést követően  $\text{NH}_4^-$  pulzust alkalmaztunk bumetanide jelenlétében és hiányában. Az NKCC1 aktivitásának statisztikailag szignifikáns mértékű fokozódását tapasztaltuk a sejt permeábilis cAMP-analóg 8-bromo cAMP hatására.

## **4.2. A CFTR által közvetített klorid transzport szerepe a könnytermelésben**

### **A CFTR szerepe a könnytermelésben és a cornea fluoreszcein festődésében CFTR KO egértörzsek esetén**

A CFTR vad típus (WT) és knock-out (KO) egértörzsek három különböző csoportjában (8-10 hetes, 14-16 hetes, 20-24 hetes életkorú csoportok) végeztünk könnytermelés mérést. A vizsgált egyedek mindkét szemén mért értékeket átlagoltuk és értékeltük. A knock-out állatokban a könnytermelés minden életkor esetén kisebb mértékű volt, mint a vad típusú alomtársak esetén. Az életkor könnytermelésre gyakorolt hatásának vizsgálata érdekében a méréseket nem csupán vertikálisan (az egyes korcsoportokon belül a KO és WT értékeinek összehasonlítása), hanem horizontálisan (különböző korcsoportok közötti értékek összehasonlítása KO és WT esetén) is elvégeztük. A vad típusú törzsben 14-16 hetes



életkorban szignifikánsan nagyobb mértékű volt a könnytermelés, mint a 8-10 hetes korcsoportban. A 14-16 hetes és a 20-24 hetes életkorú csoport értékei között nem mutatkozott különbség. A knock-out törzsek esetén nem mutatkozott eltérés a különböző korcsoportok könnytermelésében. A fluoreszcein festést a 8-10 és 20-24 hetes életkorú korcsoportban végeztük mind KO mind WT állatokban. A festődés mértékét az egyedek mindkét szemén meghatároztuk. A cornealis festődés értéke mindhárom életkorban szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott a vad típus esetén, mint a knock-out állatokban.

#### **CFTR WT és KO állatok könnymirigyének H&E festése**

A KO és WT állatok könnymirigyében egyik életkorban sem tapasztaltunk struktúrális eltéréseket.

#### **CFTR WT és KO állatok könnymirigyének immunfluoreszcein festése**

A CFTR fehérje megtalálható a WT állatokból származó könnymirigyek duktális sejtjeinek apikális membránjában. Amíg a duktuszok esetén erőteljes festődés volt látható, addig az acinus sejtek membránja nem mutatott festődést. Amint az várható volt, a CFTR fehérjét nem lehetett kimutatni a CFTR KO állatok könnymirigyében.

#### **CFTR WT és KO állatok könnymirigyéből izolált duktuszok forskolin indukálta folyadékszekréciója**

A forskolin 14-24- hetes életkorú, CFTR WT és KO állatok könnymirigyéből izolált inter és intralobularis duktuszok működésére gyakorolt hatását vizsgáltuk HEPES-pufferelt és  $\text{HCO}_3^-$ -pufferelt oldatban. A forskolin stimuláció hatására a WT állatokból származó duktuszok folyamatos hízásnak indultak, míg KO állatok duktuszai esetén nem lehetett szekréció fokozódást észlelni.  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldat használatát követő forskolin stimuláció gyors szekréciót eredményezett WT duktuszokban, míg KO duktuszok esetén nem lehetett szekrécióváltozást kimutatni. A forskolin stimuláció hatására bekövetkező szekréciófokozódás mértékében nem volt szignifikáns különbség HEPES és  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -pufferelt oldat használata esetén.

## 5. MEGBESZÉLÉS

A száraz szem betegség a leggyakoribb szemészeti kórkép, mely világszerte emberek millióit érinti. Az elmúlt évek fejlesztései ellenére a terápiás lehetőségek korlátozottak, a betegség kezelése komoly kihívást jelent. A könny szekréció egy olyan komplex folyamat, melyben a fő könnymirigyen kívül járulékos könnymirigyek, Meibom-mirigyek és a szaru- és kötőhártya hámsejtjei is részt vesznek. A könny legfontosabb folyadék, elektrolit és fehérje forrása a könnymirigy, melynek működési elégtelensége száraz szemet eredményez. A könnymirigy szekréciójának élettani és kórélettani folyamatairól ismereteink korlátozottak, ezen ismeretek azonban elengedhetetlenek az új kezelési stratégiák kidolgozásához. Sajnálatos módon a könnymirigyek ductális sejtjeinek szerepét sokáig alulértékelték az acinusok sejtjeivel szemben, de a közelmúlt kutatásai alapján egyértelmű a ductuszok fontos és elengedhetetlen szerepe a könnytermelésben. Laboratóriumunk munkájának középpontjában a ductális sejtek könnymirigy szekréciós működésben betöltött szerepének kutatása áll. Jelen munkánk során a ductális sejtek legfőbb klorid szállító transzportereit vizsgáltuk, úgymint a basolateralis felszínen az NKCC1-t és az apikális membránon a CFTR transzportert. A könnymirigy ductuszok szekrécióját olyan különböző ioncsatornák és transzporterek szabályozzák, mint pl. a NKCC1, bár a szekréciós folyamatokban betöltött szerepük még nem teljes mértékben ismert. Jelen munkánk során immunfluoreszcencia segítségével igazoltuk az NKCC1 expresszióját a nyúl könnymirigy ductális sejtjeinek basolateralis membránjában. A könnymirigy ductális sejtek NKCC1 aktivitását befolyásoló különböző tényezőket is vizsgáltuk. Amíg a hiperozmotikus környezet kifejezett mértékben fokozta az NKCC1 aktivitását, addig a kolinerg agonista karbacholnak nem volt jelentős hatása a transzporter működésére. Ez a megállapítás összhangban van a korábbi eredményeinkkel, miszerint a kolinerg stimuláció kifejezetten gyenge folyadékszékreciót idézett elő a nyúl könnymirigyből izolált ductuszokon.

A kolinerg celluláris jelátviteli utak szerepének tisztázására  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A23187-nak, valamint a protein kináz C (PKC) aktivátor PMA-nak a hatását is vizsgáltuk. Kísérleteink során a  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore segítségével kiváltott citoszolikus  $\text{Ca}^{2+}$  emelkedés nem aktiválta a NKCC1-t. Ezzel ellentétben a protein kináz C PMA-val történő közvetlen stimulálása az NKCC1 aktivitásának fokozódását okozta, bár a kotranszporter aktiválódásának mértéke gyenge volt. Ezt az ellenmondást a karbachol (nincs NKCC1 aktiválódás) és a PMA (van NKCC1 aktiválódás) hatása között magyarázhatja, hogy a kolinerg stimuláció által kiváltott PKC aktiválódás kisebb mértékű, mint a PMA által okozott direkt és kifejezett transzporter

aktiválódás. A karbachol NKCC1-re gyakorolt hatásának hiánya magyarázható a kotranszporter gyors kolinerg hatású internalizációjával. A paraszimpatikus idegrendszer az acetilkolin mellett VIP-et is felszabadít. Ennek a transzporternek az aktiválódása döntően a citoszolikus cAMP-szint emelkedése révén zajlik, a folyamatban kisebb mértékben a  $\text{Ca}^{2+}$  jelátvitel is szerepet játszik. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a VIP stimuláció hatására az NKCC1 aktivitása jelentős mértékben fokozódott.

A CFTR-nak a különböző epiteliális sejtek szekréciós folyamataiban játszott szerepét korábban már széles körben vizsgálták. A CFTR fehérje hiánya vagy hibás működése kóros  $\text{Cl}^-$  kiválasztást és következményesen nem megfelelő folyadékszekréciót eredményez a hasnyálmirigy, a légzőrendszer és a nyálmirigy epitéliumában. A CFTR könnymirigy működésében betöltött szerepéről azonban keveset tudunk. Vizsgálatunkban KO egértörzsek mindhárom korcsoportjában csökkent könnytermelést és a cornea megnövekedett fluoreszcien festődését találtuk az azonos életkorú WT alomtársakkal összehasonlítva, mely a CFTR könnytermelésben és a szemfelszín integritásának megtartásában betöltött fontos szerepére utal. A vad típusú törzsben szignifikánsan nagyobb mértékű könnytermelést mértünk 14-16 hetes életkorban, mint a 8-10 hetes korcsoportban. A knock-out törzsek esetén nem lehetett megfigyelni ezt az életkorral járó szekréció növekedést, melyet a könnytermelés károsodott tartalékkapacitása magyarázhat. Eredményeink alapján a KO egértörzsek megfelelő modelljei a CFTR könnytermelésben betöltött funkciójának a vizsgálatára.

A szövettani vizsgálatok nem mutattak ki szignifikáns morfológiai különbséget a WT és KO állatok könnymirigyének szövetei között sem a 8-10 hetes, sem a 20-24 hetes korcsoportban. Ennek alapján a betegség progressziója során a funkcionális károsodás megelőzheti a morfológiailag kimutatható változások megjelenését. Immunhisztokémiai vizsgálataink a CFTR fehérje túlsúlyát igazolták a duktális a csatorna sejtekben az acinusokhoz képest. Ezért a CFTR könnymirigy működésében betöltött szerepének további tisztázására CFTR WT és KO állatok könnymirigyéből izolált duktuszokat vizsgáltunk. A CFTR KO állatok duktuszain videomikroszkópos módszerrel a forskolin stimuláció hatására bekövetkező folyadékszekréció teljes hiányát tapasztaltuk, mely mutatja, hogy a CFTR fontos szerepet játszik az egér könnymirigy duktális sejtjeinek szekréciós folyamataiban. A cAMP-mediált folyadékszekréció hiánya a CFTR KO csatornáknak azt mutatja, hogy a CFTR lehet az egyetlen cAMP-függő transzporter az egér könnymirigy duktális sejtjeinek luminális felszínén. A CFTR fehérje duktális sejteken megfigyelt túlsúlyát figyelembe véve a CFTR a duktális szekréció módosításával befolyásolhatja a könnymirigy működését. A CFTR

transzporterén keresztül történő  $\text{Cl}^-$  szekréció jelentősen hozzájárulhat a transzmembrán elektrokémiai gradienshez és így az elektrolit és a víz mozgásához, ezért a CFTR defektusai jelentős mértékben károsíthatják a könnymirigy ductuszok  $\text{Cl}^-$  és folyadékszékrecióját. Jelenlegi eredményeink azt bizonyítják, hogy a CFTR nem csak a szaruhártya és a kötőhártya epiteliális sejtjeinek a működését, hanem könnymirigy ductális sejtjeinek a szekrécióját is befolyásolja.

## **6. ÖSSZEFOGLALÁS**

A bemutatott eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy az NKCC1 funkcionálisan jelen van a nyulak könnymirigyének ductális epitelsejtjein, valamint ez a transzporter lehet a basolaterális  $\text{Cl}^-$  felvétel legfőbb útja. Eredményeink azt is mutatták, hogy a CFTR KO egerekben csökkent a könnytermelés és fokozott mértékű a szemfelszín integritásának károsodása, igazolva ezzel a CFTR-nak ezekben a funkciókban betöltött fontos szerepét. Izolált ductusz szegment modelleinken végzett kísérleteink alapján a CFTR kulcsszerepet játszik a könnymirigy ductuszok folyadékszékreciójában. További vizsgálatokra van szükség annak tisztázására, hogy a CFTR működésének befolyásolása lehet-e célpontja a könnymirigy szekréció fokozásának, és ezáltal szerepet játszhat-e a száraz szem kezelésében.

**Az értekezésben a könnymirigy ductuszok vizsgálatával kapcsolatosan bemutatott eredmények a következők:**

- 1. NKCC1 expresszálódik a nyúl könnycsatorna ductális sejtjeinek basolaterális membránjában.**
- 2. A transzporter működését aktiválja az alacsony intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentráció, a hiperozmoláris környezet, a megemelkedett citoszolikus cAMP szint, és jelentősen kisebb mértékben a protein kináz C direkt aktiválása.**
- 3. A könnymirigy kutatásban először és eddig egyedülálló módon CFTR KO egértörzsön vizsgáltuk a CFTR szerepét a szemfelszín integritásában és a ductális folyadék szekrécióban.**
- 4. CFTR KO egerek könnytermelése szignifikánsan alacsonyabbnak, cornealis fluoreszcein festődési pontszáma magasabbnak bizonyult az azonos nemű és életkorú WT egerekhez viszonyítva. Megállapítottuk, hogy a CFTR jelentős**

szerepet játszik a könnytermelésben és a szemfelszín integritásának fenntartásában.

5. A CFTR könnymirigyben való jelenlétét vizsgálva megállapítottuk, hogy a CFTR protein elsősorban a ductuszok apikális membránjában található meg.
6. A további kísérletek során az általunk korábban kifejlesztett eljárással izolált könnymirigy ductusz modellen vizsgáltuk a CFTR WT és KO egerek könnymirigyének folyadékszekrécióját. A cAMP szintjének forskolin által kiváltott emelkedése jelentős szekréciós választ eredményezett a WT ductuszokon, míg a CFTR KO egerek könnymirigyéből izolált ductuszokon nem volt mérhető folyadék szekréció. Megállapítottuk, hogy a CFTR elsősorban a ductális folyadék szekréció módosítása révén befolyásolja a könnymirigy működését.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretnék köszönetet mondani és legmélyebb hálámat kifejezni **Dr. Tóth-Molnár Editnek**, aki bevezetett a kutatómunkába és aki mindvégig segített és irányított PhD tanulmányom során. Hozzáállása, inspirációja és tanácsai segítették ennek a dolgozatnak a megírását, nélküle ez a munka nem készülhetett volna el.

Rendkívül hálás vagyok **Prof. dr. Varró Andrásnak**, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet tanszékvezetőjének, hogy munkám során nagyszerű inspiráló tudományos környezetben dolgozhattam.

Köszönettel tartozom **Prof. dr. Hegyi Péternek** és **Prof. dr. ifj. Rakonczay Zoltánnak**, akik helyet és lehetőséget biztosítottak a Pancreas Kutatócsoport eszközeinek és műszereinek használatára.

Szeretném megköszönni **Prof. dr. Facskó Andreának**, a Szemészeti Klinika tanszékvezetőjének a kísérleti munkámhoz szükséges idő biztosítását.

Különösen hálás vagyok **Berczeli Orsolyának**, **Dr. Katona Máténak** és a **Pancreas Munkacsoport minden tagjának** a folyamatos támogatásért és segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban őszinte hálámat szeretném kifejezni **szüleimnek** végtelen szeretetükért és támogatásukért.